

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Dezember 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/096414 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 31/385**,
31/401, 31/403, 31/137, A61P 13/12 // (A61K 31/385,
31:137) (A61K 31/401, 31:385) (A61K 31/403, 31:385)

(74) Anwalt: **MÜLLER, Wolfram, H.**; Maikowski & Ninnemann, Postfach 15 09 20, 10671 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/01991

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Mai 2002 (24.05.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Angaben zur Priorität:
101 25 883.6 28. Mai 2001 (28.05.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **SERUMWERK BERNBURG AG** [DE/DE]; Hallesche Landstrasse 105 b, 06406 Bernburg (DE).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **TÄGER, Michael** [DE/DE]; Akazienstrasse 29, 39326 Heinrichsberg (DE). **ANSORGE, Siegfried** [DE/DE]; Am Sportplatz 17, 39291 Hohenwarthe (DE). **FRIES, Gerhard** [DE/DE]; Lange Göhren, 39171 Osterweddingen (DE). **KOEGST, Dieter** [DE/DE]; Lange Göhren 3, 39171 Osterweddingen (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **MEDICAMENT CONTAINING AN EFFECTOR OF THE GLUTATHIONE METABOLISM TOGETHER WITH ALPHA-LIPOIC ACID FOR USE IN KIDNEY REPLACEMENT THERAPY**

(54) Bezeichnung: **ARZNEIMITTEL ENTHALTEND EINEN EFFEKTOR DES GLUTATHIONMETABOLISMUS ZUSAMMEN MIT ALPHA-LIPONSÄURE IM RAHMEN DER NIERENERSATZTHERAPIE**

(57) Abstract: The invention relates to a medicament containing an effector of the glutathione metabolism together with α -lipoic acid, its salts and/or prodrugs as a combined preparation for the simultaneous, separate or time-controlled treatment of a defective thiol-disulfide status in kidney replacement therapy and of clinical characteristics, which indicate a disorder of the thiol-disulfide status of immunocytes. The correction of a defective thiol metabolism is of fundamental importance as a basic therapy for treating a large number of diseases of different origin, in particular however in circumstances requiring an essential kidney replacement therapy.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Arzneimittel enthaltend einen Effektor des Glutathionmetabolismus zusammen mit Alpha-Liponsäure, deren Salze und/oder deren Prodrugs als Kombinationspräparat zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Behandlung einer Störung des Thiol-Disulfid-Status im Rahmen der Nierenersatztherapie sowie Krankheitsbildern, bei denen eine Störung des Thiol-Disulfid-Status von Immunzellen auftritt. Die Korrektur eines gestörten Thiolstoffwechsels erlangt grundlegende Bedeutung als Basistherapie bei der Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen unterschiedlicher Genese, insbesondere jedoch unter den Bedingungen einer notwendigen Nierenersatztherapie.

WO 02/096414 A1

Arzneimittel enthaltend einen Effektor des
Glutathionmetabolismus zusammen mit α -Liponsäure im
Rahmen der Nierenersatztherapie

5 Die Erfindung betrifft die Verwendung der Kombination
von α -Liponsäure und Effektoren des Glutathionmetabo-
lismus zur Behandlung von Störungen des zellulären
Thiolstatus und damit einhergehenden Erkrankungen im
Rahmen der Nierenersatztherapie.

10 Die Feinregulation des Thiol-Disulfid-Status stellt
eine der wichtigsten Grundvoraussetzungen biologi-
scher Stoffwechselleistungen dar. Das zentrale Regu-
lationselement innerhalb dieses Systems ist das Tri-
15 peptid Glutathion, welches intrazellulär in reduzier-
ter Form relativ hohe Konzentrationen (bis zu 10 mM)
erreicht. Neben dem Glutathion sind Thiol-Gruppen
tragende Proteine intrazellulär und insbesondere in
zellmembrangebundener Form weitere bedeutende Bau-
20 steine des Thiol-Disulfidstatus jeder Zelle.

Der durch verschiedene Enzymklassen regulierte Meta-
bolismus der Disulfidspaltung und Thiolgruppenbildung
ist durch die Vielfalt seiner biologischen Funktionen
25 u. a. bei zellulären Wachstums- und Differenzierungs-
prozessen einschließlich des programmierten Zelltodes
sowie Zellschutz- und Entgiftungsmechanismen in sei-
ner Intaktheit unabdingbar für jede normale Zellfunk-
tion. Störungen in diesem System und Veränderungen
30 der Konzentration der Thiole führen zu schwerwiegen-
den zellulären Funktionsstörungen, die nur im Einzel-

fall lokal begrenzt bleiben, in der Regel jedoch den gesamten Organismus beeinträchtigen.

5 In einer Vielzahl von Untersuchungen konnte die Beteiligung eines gestörten Thiol-Disulfid-Status bei akuten und chronischen Erkrankungen nachgewiesen werden.

10 So wurden beispielsweise in bestimmten Nervenzellen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Parkinsonschen Krankheit deutliche Veränderungen des Thiolstoffwechsels nachgewiesen (Brain Res Rev 1997;25:335-358). Es gibt deutliche Hinweise darauf, daß es in Folge dieser Stoffwechselstörung zu einem
15 vermehrten Untergang der für die Symptomatik der Erkrankung maßgeblich verantwortlichen Nervenzellen in funktionell beeinträchtigten Hirnarealen, den Basalganglien, kommt (Ann Neurol 1994;36:348-355).

20 Verringerte Glutathionspiegel bzw. ein verringerter intrazellulärer Glutathiongehalt wurde weiterhin im Rahmen von Gefäßerkrankungen und deren Folgezuständen - Arteriosklerose und Herzinfarkt - in den, die Gefäßinnenwand auskleidenden Endothelzellen gefunden (Med
25 Sci Res 1998;26:105-106).

Lungenerkrankungen, welche mit einem Umbau des Lungengewebes einhergehen, sind regelmäßig mit einem Glutathiondefizit im Gewebe verbunden. Bei einer solchen Lungenfibrose verläuft der Schweregrad der Erkrankung parallel zum Thiolverlust (Clin Chim Acta
30 1997;265:113-119). Schwere entzündliche Lungenerkran-

kungen, untersucht am Beispiel des akuten Atemnotsyndromes des Erwachsenen, werden von einer Dysregulation des Thiolstoffwechsels der beteiligten Entzündungszellen (Granulozyten) begleitet (Chest 1996;109:163-166).

Immunkompetente Abwehrzellen des Bronchialsystems (Alveolarmakrophagen) von Rauchern und Patienten mit chronisch-obstruktiven Atemwegserkrankungen weisen nach eigenen Untersuchungen ein schweres zelluläres Thioldefizit auf. Der Grad der Störung des zellulären Thiolstatus korreliert dabei direkt mit Einschränkungen der Lungenfunktion (Free Radic Biol Med 2000; 29:1160-1165).

In den letzten Jahren wurden darüber hinaus vermehrt Hinweise auf einen geschädigten Thiolstoffwechsel bei chronischen Nierenerkrankungen (Ren Fail 1998;20:117-124), Anämien (Br J Haematol 1995;91:811-819), unreifen Neugeborenen (Pediatr Pulmonol 1995;20: 160-166), lärmbedingtem Hörverlust (Brain Res 1998;784:82-90), entzündlichen Darmerkrankungen (Gut 1998;42:485-492) sowie bei Diabetes mellitus (Metabolism: Clinical and Experimental 1998; 47(8):993-997) gefunden.

Umfangreiche Untersuchungen zur Bedeutung des Glutathionstoffwechsels bei Virusinfektionen wiesen sowohl eine, auf einer geschädigten zellulären Abwehr basierende, schlechtere Prognose thioldefizienter Zellen als auch eine antivirale, die Virusvermehrung hemmende Funktion des Glutathions nach (Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:1967-1972).

Das zelluläre Immunsystem des Menschen, bestehend aus den weißen Blutzellen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten stellt ein auf eine Störung im Thiolstoffwechsel besonders empfindlich reagierendes System dar.

Minimale Änderungen, insbesondere Verluste zellulären Glutathions können ein kaskadenartiges Programm zur Selbstzerstörung der Zelle, den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen (FASEB J 1998;12:479-486). Der Thiol-Disulfidstoffwechsel wirkt hier als ein zentrales Stellglied eines intakten Immunsystems, ohne welches der Organismus nicht lebensfähig wäre.

Eigene Untersuchungen zeigten, daß insbesondere unter den Bedingungen einer hochgradig eingeschränkten Nierenfunktion und dadurch erforderlicher Nierenersatztherapie in Form der Hämo- bzw. Peritonealdialyse der zelluläre Thiol-Disulfidstoffwechsel schwer gestört ist. Diese Störung hat u.a. einen weitgehenden Verlust normaler Zellfunktionen, wie der Phagozytosefähigkeit von Peritonealmakrophagen oder der Aktivierbarkeit von Lymphozyten zur Folge. Regelmäßig werden bei diesen Patienten neben dem bestehenden lokalen Immundefizit, welches durch häufige Infektionen der Bauchhöhle gekennzeichnet ist, auch eine deutlich verringerte immunologische Abwehr mit gesteigerter allgemeiner Infektanfälligkeit gefunden. Beschrieben sind hier insbesondere Funktionsstörungen und eine verringerte Aktivierbarkeit der Lymphozyten und Makrophagen sowie Imbalancen der immunregulatorischen

Zytokine (Immunobiol 1999;200:62-76).

Die Korrektur eines gestörten Thiolstoffwechsels erlangt somit grundlegende Bedeutung als Basistherapie bei der Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen unterschiedlicher Genese, insbesondere jedoch unter den Bedingungen einer notwendigen Nierenersatztherapie.

α -Liponsäure wird bislang mit relativem Erfolg zur Behandlung von neurotoxisch bedingten Mißempfindungen im Rahmen der diabetischen Polyneuropathie als neuroprotektive Substanz eingesetzt (Diabetologica 1995; 38:1425-1433, Diabetes Res Clin Pract 1995;29:19-26, Diab Care 1999;22:1296-1301, Drug Metab Rev 1997; 29:1025-1054, DE 43 43 592 C2). Aus der DE 44 47 599 C2 und der EP 0 530 446 B1 ist darüber hinaus die Verwendung von α -Liponsäure bei weiteren neuronalen Störungen einschließlich Tinnitus und Hörsturz bekannt.

Der zytoprotektive Wirkmechanismus hier beruht neben der Beeinflussung der zuckerabhängigen Proteinmodifikation (Proteinglykosylierung) sowie einer Verringerung der neurotoxischen Ketonkörpergenese letztendlich auf der antioxidativen Funktion der α -Liponsäure und deren Metabolite (Free Radic Biol Med 1995;19:227-250).

Diese Zellschutzfunktion wurde besonders unter dem Aspekt der Verhinderung des oxidativen Umbaus von es-

sentiellen ungesättigten Fettsäuren untersucht. Eine solche Hemmung der Lipidperoxidation stellt neben der Anwendung der α -Liponsäure als Neuroprotektivum die Basis für eine Applikation als Leberschutzmedikament bei verschiedenen Intoxikationen und Lebererkrankungen dar (Biochemistry 1998;37:1357-1364).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß α -Liponsäure die Vermehrung des HI-Virus auf unterschiedlichen Entwicklungsstufen hemmt und somit einer Progression der AIDS-Erkrankung entgegenwirken könnte. Die Ergebnisse dieser Laborversuche konnten allerdings nur eingeschränkt auf klinische Studien übertragen werden (FEBS-Lett 1996;394:9-13). Ähnliches gilt für den Nachweis einer entzündungshemmenden Funktion der Substanz für die insulinproduzierenden Inselzellen der Bauchspeicheldrüse (Agents Actions 1993;38:60-65).

In der EP 0 812 590 A2 sowie der EP 0 427 247 B1 wird die Verwendung von α -Liponsäure als Zytoprotektivum, Antischmerzmittel sowie als Medikament bei Entzündungserkrankungen offenbart.

Die antioxidativen Eigenschaften der α -Liponsäure beruhen neben der Fähigkeit Chelate mit Metallionen zu bilden sowie direkt Radikale zu eliminieren insbesondere auf der Funktion als starkem Reduktionsmittel. Um diese Reaktion intrazellulär auszuführen, muss α -Liponsäure selbst in reduzierter Form, als Dihydroliponsäure vorliegen. Die Überführung von (disulfidi-

scher) α -Liponsäure mittels Reduktion in die Dithiolform der Dihydroliponsäure verbraucht seinerseits reduzierende Äquivalente, wobei dieser Vorgang u.a. durch das Enzym Glutathionreduktase katalysiert wird (Gen Pharmacol 1997;29:315-331). Dies stellt offenbar die Ursache für die hinsichtlich der Thiolrestitution bislang unbefriedigende Wirkung der Substanz dar.

Die DE 44 20 102 A1 beschreibt eine Arzneimittelkombination aus α -Liponsäure und herz-kreislaufaktiven Substanzen, insbesondere einem organischen Nitrat, einem Calcium-Antagonisten, ACE-Hemmer oder Oxyfedrin. Die Arzneimittelkombination soll zur Behandlung von Herz-Kreislaufferkrankungen sowie diabetisch bedingten Erkrankungen eingesetzt werden.

Ambroxol, d.h. trans-4-(2-Amino-3,5-dibromobenzylamino)-cyclohexanhydrochlorid wird in verschiedenen Darreichungsformen bei Lungen- und Bronchialerkrankungen als schleimlösendes Medikament eingesetzt (WO 96 33704, GB 2239242, WO 01 05378). Darüber hinaus ist die Verwendung bei Hyperurikämie aus der DE 35 30 761 bekannt. Die Wirkung des Ambroxol als Mukolytikum beruht sowohl auf einer Stimulation der Surfactantproduktion der Bronchialzellen als auch insbesondere auf der Fähigkeit, freie Radikale zu eliminieren (Respir Med 1998;92:609-23). Diese hierauf basierende antioxidative Aktivität der Substanz wurde hauptsächlich an pulmonalen Zellen (Pharmacol 1999;59:135-141) aber auch im Rahmen von entzündlichen Mechanismen nachgewiesen (Inflamm Res 1999;48:86-93). Weiterhin

ist bekannt, dass in vitro durch den Zusatz von Am-
broxol in hohen Dosen regulatorische Enzyme des
Glutathionstoffwechsels direkt beeinflusst sowie per-
oxidative Prozesse gehemmt werden (Arch Vet Pol
1992;32:57-66).

Hemmer des Angiotensin-Converting Enzymes (Angioten-
sin-Converting Enzyme Inhibitors, ACE-Hemmer) werden
mit großem Erfolg bei der Behandlung einer breiten
Palette kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt. Die
Ursache der hier genutzten blutdrucksenkenden Wirkung
beruht auf der Hemmung der Umwandlung von Angioten-
sin I in Angiotensin II. Darüber hinaus wurden ACE-
Hemmer auch als Effektoren des Glutathionstoffwech-
sels beschrieben. Neben Untersuchungen zu diesbezüg-
lichen Effekten bei Herz-Kreislauf- und Gefäßerkran-
kungen (J Cardiovasc Pharmacol 2000;36:503-509) wur-
den allgemeine Regulationsprinzipien untersucht (Clin
Nephrol 1997;47:243-247). Zu unterscheiden sind hier
die Wirkungen SH-Gruppen tragender ACE-Hemmer wie
z.B. Captopril (1-[(2S)-3-Mercapto-2-methylpropion-
yl]-L-prolin) von SH-freien ACE-Hemmern wie z.B.
Enalapril (1-{N-[(S)-1-Ethoxycarbonyl-3-phenylprop-
yl]-L-alanyl}-L-prolin). Erstere reagieren direkt als
Radikalfänger antioxidativ während SH freie ACE-
Inhibitoren dazu primär nicht in der Lage sind. Bei-
den Gruppen gemeinsam ist die Beeinflussung des
Glutathionredoxzyklusses über die Regulation der
Glutathionreduktase und Glutathionperoxidase sowie
weiterhin der Superoxiddismutase (Am J Physiol Regu-
latory Integrative Comp. Physiol.2000;278:572-577).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, neuartige, thiolreaktive Substanzen enthaltende Arzneimittel zur verbesserten Stabilisierung eines geschädigten Thiol-Disulfidstatus, insbesondere bei Niereninsuffizienz im Rahmen der Nierenersatztherapie, und zur Restitution der dadurch ausgelösten Funktionsverluste bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Arzneimittel mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. In Anspruch 13 wird die Verwendung der Wirkstoffe zur Herstellung eines Arzneimittels beschrieben. Die weiteren abhängigen Ansprüche zeigen jeweils vorteilhafte Weiterbildungen auf.

Erfindungsmäßig werden dabei Effektoren des Glutathionmetabolismus in Kombination mit α -Liponsäure, deren Salze und/oder deren Prodrugs eingesetzt.

Überraschenderweise konnte gezeigt werden, daß durch die Applikation der erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden Kombination von α -Liponsäure und einem Effektor des Glutathionmetabolismus eine Normalisierung des primär verringerten Thiolstatus von Immunzellen erfolgte. Die thiolstabilisierende Wirkung der Kombinationen überstieg dabei die der alleinigen Verwendung von α -Liponsäure oder der jeweiligen Effektoren nicht nur regelmäßig, vielmehr konnten auch superadditive Effekte nachgewiesen werden. Die Restitution des Thiolstatus erfaßte dabei sowohl intrazelluläre

Thiole als auch membrangebundene SH-Gruppen und ist somit Ausdruck einer komplexen biologischen Regulation. Dieses Phänomen beruht darauf, daß die Effektoren des Glutathionstoffwechsels einerseits intermediär
5 entstehende freie Radikale eliminieren und andererseits die Verfügbarkeit reduzierender Äquivalente für die Umwandlung der α -Liponsäure aus disulfidischer in reduzierte Form erhöhen und somit die Synthese-induzierende Wirkung der α -Liponsäure auf den Thiol-
10 Disulfidstatus verbessern.

Darüber hinaus wurde deutlich, daß eine thiolsteigernde Wirkung der Kombination von Effektoren des Glutathionmetabolismus und α -Liponsäure nur bei primär thioldefizienten Immunzellen auftrat. Gesunde Immunzellen, welche keine Alteration des Thiol-
15 Disulfidstatus aufwiesen, reagierten nicht mit einer weiteren Steigerung der SH-Konzentration.

Die Restitution des Thiolstatus der Immunzellen wurde begleitet von einer Normalisierung funktioneller Parameter. Dies betraf insbesondere die immunmodulatorischen Effekte im Rahmen der Aktivierbarkeit von T-Lymphozyten.
20

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die erfindungsmäßig zur Anwendung kommenden Kombinationen den Thiol-Disulfidstatus von weiteren Immunzellen wie den Peritoneal-makrophagen dialysepflichtiger Patienten
25 stabilisierten. Die Peritonealmakrophagen wiesen vor der Behandlung mit α -Liponsäure / Ambroxol bzw. α -
30

Liponsäure / ACE-Hemmern neben einem defizienten Thiolstatus einen nahezu vollständigen Verlust ihrer Phagozytosefunktion sowie eine schwere Störung der Differenzierung und Zytokinsynthese auf, welche als

5 ursächlich für die hohen Infektionsraten bei diesen Patienten beschrieben sind. Diese Funktionsverluste konnten durch die Zugabe der erfindungsgemäß benannten Kombinationen aufgehoben werden.

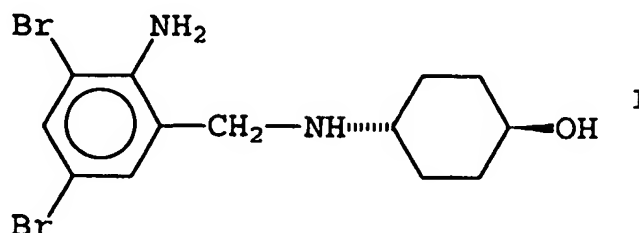
10 Besonders geeignet ist dieses Arzneimittel im Rahmen der Nierenersatztherapie sowie weiteren Krankheitsbildern, bei denen eine Störung des Thiol-Disulfid-Status der Immunzellen auftritt. Dabei kann die Behandlung gleichzeitig, in getrennten Formulierungen

15 oder auch zeitlich abgestuft erfolgen.

Die erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden Kombinationspräparate können in den üblichen pharmakologischen Darreichungsformen oder als Instillat sowie

20 prophylaktisch als auch therapeutisch verabreicht werden. Die effektive Dosis ist dabei fallbezogen zu ermitteln. Bevorzugt liegt sie bei der humanmedizinischen Applikation beim Patienten zwischen 30 und 1200 mg/d, besonders bevorzugt zwischen 200 und 600 mg/d.

25 In einer Variante wird als Effektor des Glutathionmetabolismus Ambroxol der allgemeinen Formel I,



dessen Salz und/oder dessen Prodrug verwendet. Die Dosis von Ambroxol für die humanmedizinische Applikation liegt dabei bevorzugt zwischen 7,5 und 90 mg/d, besonders bevorzugt zwischen 60 und 75 mg/d.

5

In einer weiteren Variante wird als Effektor des Glutathionmetabolismus ein Inhibitor des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE-Hemmer) verwendet. Hier liegt die bevorzugte Dosis für die humanmedizinische Applikation zwischen 0,2 und 20 mg/d.

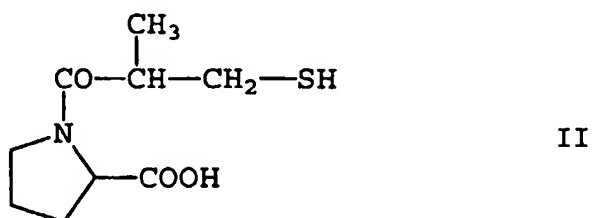
10

Als ACE-Hemmer können dabei z.B. folgende Verbindungen eingesetzt werden:

15

- A) 1-[(2S)-3-Mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin (Captopril) der Formel II

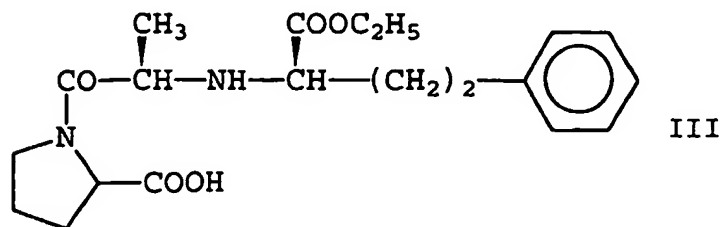
20



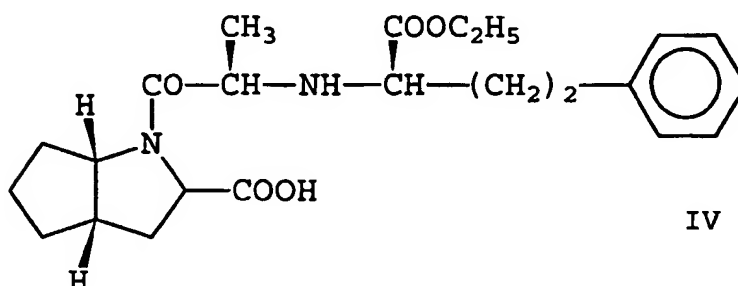
25

- B) 1-{N-[(S)-1-Ethoxycarbonyl-3-phenylpropyl]-L-alanyl}-L-prolin (Enalapril) der Formel III

30



C) (2S,3aS,6aS)-1-[(S)-N-[(S)-1-Ethoxycarbonyl-3-phenylpropyl]-alanyl]-octahydrocyclopenta[b]pyrrol-2-carbonsäure (Ramipril) der Formel IV



Die Arzneimittel können dabei oral oder auch parenteral verabreicht werden.

Zusätzlich kann das Arzneimittel gängige Additive enthalten. Hierzu zählen z.B. wäßrige Lösungsmittel, Stabilisatoren, Suspensions-, Dispersions- und Benetzungsmittel.

Das Arzneimittel kann in beliebiger Formulierung hergestellt werden. Beispielsweise gehören hierzu Lösungen, Granulate, Pulver, Emulsionen, Tabletten und/oder Filmtabletten.

Erfindungsgemäß wird ein Effektor des Glutathionmetabolismus zusammen mit α -Liponsäure, deren Salz und/oder deren Prodrugs zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer Störung des Thiol-Disulfid-Status von Immunzellen im Rahmen der Nierenersatztherapie, verwendet.

Ebenso kann ein Effektor des Glutathionmetabolismus zusammen mit α -Liponsäure, deren Salz und/oder deren Prodrugs zur Herstellung eines Arzneimittels zur immunmodulatorischen, abwehrsteigernden und/oder entzündungshemmenden Behandlung eingesetzt werden.

Die Komponenten des Kombinationspräparats können dabei sowohl in einer einzigen Formulierung als auch in getrennten Formulierungen vorliegen.

Die erfindungsmäßige Verwendung der Kombination von α -Liponsäure und Effektoren des Glutathionstoffwechsels wird anhand der folgenden Beispiele und Figuren näher beschrieben.

Beispiel 1

Einfluß auf den zellulären Thiolstatus peripherer Immunzellen des Menschen

Periphere Immunzellen von gesunden Spendern (n=9) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem peripheren Blut isoliert. Die Hauptfraktion der resultierenden Gesamtpopulation mononukleärer Zellen stellen dabei regelmäßig Lymphozyten mit einem spenderabhängigen relativen Anteil von ca. 90% dar. 10% der mononukleären Zellen werden durch Monozyten repräsentiert.

Die erhaltenen mononukleären Zellen wurden in speziellen Zellkulturmedien aufgenommen und in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuch-

te von 98% und 5% relativem Luft-CO₂-Gehalt inkubiert. Der Stoffwechsel der primär ruhenden Immunzellen wurde mittels mitogener Stimulation (0,5 µg/ml Phytohämagglutinin) aktiviert. Um den Einfluß der erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden Kombinationen auf den Thiolstatus thioldefizienter Immunzellen zu prüfen, wurden diese artifiziell thioldepletiert. Dies erfolgte durch Kultivierung in thioldefizienten Medien (RPMI 1603) nach erprobten Verfahren. Vergleichskulturen unter Verwendung von Vollmedien (RPMI 1640) dienten der Definition des unter Kulturbedingungen bestmöglichen Normalwertes.

Die Bestimmung des interzellulären Thiolgehaltes auf Einzelzellebene erfolgte unter Verwendung von 5-Chloromethylfluoresceindiacetat (CMFDA) in der Durchflußzytofluorimetrie.

Primär nicht fluorogenes CMFDA wird dabei passiv von der Zelle aufgenommen. Über den Chlormethylrest erfolgt eine Bindung an zytoplasmatische Thiolgruppen. Nach Abspaltung der Acetatreste durch unspezifische zelluläre Esterasen wird dieser, nun zellmembranimpermeable Komplex bei einer Excitationswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ mit einer Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ fluorogen. Die mittlere Fluoreszenzintensität der Probe (10.000 Zellen) ist der Konzentration der intrazellulären Thiolgruppen direkt proportional.

Die Expression membrangebundener Thiolgruppen wurde ebenfalls durchflußzytofluorimetrisch ermittelt. Hierbei wurde Chloromethyltetramethylrhodamin (CMTMR)

unter den Bedingungen eines blockierten Membranpotentials sowie einer gehemmten Diffusionskapazität der Zellen als Thiolkonjugat eingesetzt. Die Fluoreszenzintensität der gebunden Fluorochrommoleküle an der Zellmembran ist dabei wiederum proportional der Menge der Thiolgruppen an der Zelloberfläche.

In Fig. 1 ist die Wirkung der Kombination von α -Liponsäure und Ambroxol (Fig. 1a) sowie α -Liponsäure und Enalapril (Fig. 1b) auf die intrazelluläre Thiolexpression von Lymphozyten dargestellt. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Kombination von α -Liponsäure und Captopril. Die Daten sind als Verhältnis der zellulären Fluoreszenzintensität zu jeweils parallel analysierten Kalibrierungspartikeln (Beads) dargestellt. Die Wirkstoffkonzentration der jeweiligen Kombination ist identisch mit den Konzentrationen der einzelnen Komponenten.

intrazelluläre Thiolexpression [$\text{mfi}_{\text{Beads/Ratio}}$]				
Kultur- dauer [d]	Kontrolle	α -Liponsäure [50 μM]	Captopril [10 μM]	α -Liponsäure + Captopril
0	2,88 \pm 0,20	2,88 \pm 0,20	2,88 \pm 0,20	2,88 \pm 0,20
1	2,31 \pm 0,20	2,81 \pm 0,23	2,80 \pm 0,21	2,89 \pm 0,31
2	1,98 \pm 0,16	2,76 \pm 0,50	2,76 \pm 0,22	2,92 \pm 0,32
3	1,63 \pm 0,15	2,63 \pm 0,60	2,49 \pm 0,26	2,88 \pm 0,41
4	1,30 \pm 0,16	2,41 \pm 0,40	2,21 \pm 0,36	2,91 \pm 0,39
6	1,10 \pm 0,13	2,23 \pm 0,50	1,83 \pm 0,33	2,93 \pm 0,35
8	0,95 \pm 0,10	2,02 \pm 0,30	1,02 \pm 0,39	2,93 \pm 0,41
10	0,81 \pm 0,10	1,89 \pm 0,30	0,91 \pm 0,46	2,90 \pm 0,45
12	0,69 \pm 0,10	1,86 \pm 0,68	0,76 \pm 0,49	2,88 \pm 0,49
14	0,65 \pm 0,08	1,83 \pm 0,60	0,75 \pm 0,56	2,86 \pm 0,47

5 Periphere Immunzellen wurden über einen Zeitraum von
 4 Tagen unter normalen (Kontrolle1640) bzw. thiolde-
 fizienten Bedingungen (1603) zur Induktion einer 10 -
 20%igen Thiolreduktion kultiviert. Wie in 1a gezeigt,
 resultiert die Zugabe von Ambroxol in Kombination mit
 10 α -Liponsäure beginnend nach 48 Stunden Behand-
 lungsdauer in einem vollständigen Ausgleich des intrazel-
 lulären Thioldefizites. Unter Verwendung der Kombina-
 tion von α -Liponsäure und dem SH-freien ACE-Hemmer
 Enalapril sowie dem SH-tragenden ACE-Hemmer Captopril
 waren diese Effekte noch quantitativ verstärkt sowie
 in der Zeitkinetik bereits nach 24 Stunden nachweis-
 15 bar. Weder durch α -Liponsäure allein noch durch die
 Einzelapplikation der Effektoren war ein vollständi-
 ger Ausgleich des Thioldefizites möglich.

Die mit diesem experimentellen Ansatz erhaltenen Re-
 sultate für den Einfluss der erfindungsmäßig benann-

ten Kombinationen auf die Expression zellmembranständiger Thiole sind in Fig. 2 für die Kombination von α -Liponsäure und Ambroxol (Fig. 2a) sowie α -Liponsäure und Enalapril (Fig. 2b) dargestellt; die folgende Tabelle gibt die Ergebnisse der Kombination von α -Liponsäure und Captopril wieder.

membranständige Thiolexpression [mfi _{Beads} /Ratio]				
Kultur- dauer [d]	Kontrolle	α -Liponsäure [50 μ M]	Captopril [10 μ M]	α -Liponsäure + Captopril
0	2,37 \pm 0,45	2,37 \pm 0,45	2,37 \pm 0,45	2,37 \pm 0,39
1	2,79 \pm 0,50	2,65 \pm 0,39	2,63 \pm 0,39	2,38 \pm 0,38
2	2,35 \pm 0,45	2,43 \pm 0,52	2,54 \pm 0,41	2,42 \pm 0,41
3	1,98 \pm 0,43	2,31 \pm 0,36	2,52 \pm 0,38	2,49 \pm 0,46
4	1,63 \pm 0,43	2,26 \pm 0,20	2,50 \pm 0,41	2,39 \pm 0,52
6	1,10 \pm 0,46	2,19 \pm 0,13	2,46 \pm 0,50	2,40 \pm 0,50
8	0,98 \pm 0,31	1,93 \pm 0,20	2,01 \pm 0,39	2,40 \pm 0,53
10	0,96 \pm 0,32	1,63 \pm 0,16	1,68 \pm 0,29	2,36 \pm 0,52
12	0,95 \pm 0,33	1,32 \pm 0,21	1,02 \pm 0,51	2,38 \pm 0,49
14	0,98 \pm 0,33	1,34 \pm 0,20	0,99 \pm 0,46	2,36 \pm 0,55

Unter der Behandlung mit der Kombination α -Liponsäure und Ambroxol kam es wiederum beginnend nach 48 Stunden zu einer signifikanten Verbesserung der membranständigen Thiolexpression. Besonders auffällig war hier, dass die Gabe der Einzelsubstanzen zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Einfluss zeigte. Die Zugabe der Kombination von α -Liponsäure und den jeweiligen ACE-Inhibitoren resultierte sowohl bei Enalapril als auch bei Captopril in einem superadditiven Effekt.

Beispiel 2

Einfluß auf den zellulären Aktivierungsstatus peripherer T-Lymphozyten des Menschen

In dem unter Beispiel 1 beschriebenen Kultivierungsansatz wurden humane T-Lymphozyten mit 1,0 µg/ml Phytohämagglutinin stimuliert. Innerhalb einer Kulturdauer von 72 Stunden wurden spezifische Marker der zellulären Aktivierung zytofluorimetrisch durch Detektion mittels monoklonaler Antikörper quantitativ nachgewiesen. Untersucht wurde der Einfluss der erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden Kombinationen auf die Aktivierungsmarker CD69 (frühes Aktivierungsantigen), CD25 (intermediäres Aktivierungsantigen) und CD71 (spätes Aktivierungsantigen) von T-Lymphozyten. In Fig. 3 ist die Wirkung der Kombination von α-Liponsäure und Ambroxol (Fig. 3a) sowie α-Liponsäure und Enalapril (Fig. 3b) auf den Aktivierungsindex von T-Lymphozyten dargestellt. Verglichen mit normalen T-Lymphozyten (Aktivierungsindex = 1,0) ist bei thioldefizienten Zellen eine, die zelluläre Funktionstörung belegende, deutliche Verringerung der Aktivierbarkeit zu verzeichnen. Nach Zugabe von α-Liponsäure tritt der bekannte Effekt einer leichten Verbesserung der zellulären Aktivierbarkeit auf, welche jedoch in keinem Fall die signifikante Abweichung von der normalen Kontrollgruppe behebt. Ambroxol zeigt keinen Einfluss auf einen der drei Aktivierungsmarker; der ACE-Hemmer Enalapril ist nur im Fal-

le der Effektivierung des CD25-Antigens der α -Liponsäure gleichwertig. Demgegenüber war sowohl bei der kombinierten Anwendung von α -Liponsäure und Ambroxol als auch α -Liponsäure und Enalapril eine Anhebung des T-Zell-Aktivierungsindex in den Normalbereich nachweisbar. Dieser Effekt wurde bei frühen, intermediären und späten Aktivierungsmarkern beobachtet. Es kann somit geschlussfolgert werden, dass die durch die kombinierte Verwendung von α -Liponsäure und den jeweiligen Effektoren des Glutathionstoffwechsels vermittelte Normalisierung des zellulären Thiolstatus einhergeht mit einer Restitution der zellulären Funktionalität.

15 **Beispiel 3**

Einfluss auf den zellulären Thiolstatus von Peritonealmakrophagen im Rahmen der Nierenersatztherapie

20 Peritonealmakrophagen wurden aus dem Effluat der Peritonealdialyse hochgradig niereninsuffizienter Patienten isoliert, in Zellkulturmedium aufgenommen und in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuchte von 98% und 7,5% relativem Luft-CO₂-Gehalt inkubiert. Um den Einfluß der erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden Kombinationen auf den Thiolstatus der Peritonealmakrophagen zu prüfen, wurden jeweils eine Fraktion mit α -Liponsäure, den Effektoren des Glutathionmetabolismus Ambroxol oder dem
25 ACE-Hemmer Enalapril bzw. mit der Kombination von α -Liponsäure / Ambroxol oder α -Liponsäure / Enalapril
30

behandelt, während jeweils eine weitere Fraktion als unbehandelte Kontrolle geführt wurde.

Die Bestimmung des zellulären Thiolstatus erfolgte mittels der unter 1. beschriebenen Meßmethode. Die Membranexpression von Thiolen wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität(mfi) der Probe (3000 Zellen/Messung) nach Kopplung an ein Chlormethyl-Fluorochromderivat bestimmt.

In der Fig. 4 ist der Effekt der Kombination von α -Liponsäure und Ambroxol (Fig. 4a) sowie α -Liponsäure und Enalapril (Fig. 4b) in der Zeitkinetik über 14 Tage dargestellt (n=12).

Unter Zusatz der Monosubstanzen war wiederum nur ein Anstieg der zellulären Thiolexpression unter Verwendung von α -Liponsäure zu beobachten, während Ambroxol und der ACE-Hemmer keinen Effekt zeigten. Demgegenüber war unter der Kombination von α -Liponsäure und Ambroxol beginnend nach 72 Stunden ein deutlicher Anstieg der zellulären Thiolexpression nachweisbar, der nach 4 Tagen Behandlungsdauer einen superadditiven Effekt sowie nach 8 Tagen ein Maximum erreichte, welches die Ausgangs- bzw. Kontrolldaten um das Dreifache überstieg (Fig. 4a). Die Kombination von α -Liponsäure und einem ACE-Hemmer (Fig. 4b) resultierte in einer ähnlichen, jedoch nochmals deutlich verkürzten Zeitkinetik. Ein Maximum der superadditiven Wirkung war hier bereits nach 48 - 72 Stunden Behandlungsdauer erreicht.

In Fig. 5 ist die Wirkung der Kombination von α -Liponsäure und Enalapril (Fig. 5b) auf die membranständige Thiolexpression von Peritonealmakrophagen in der oben beschriebenen Versuchsanordnung dargestellt. Die Membranexpression von Thiolen wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (mfi) der Probe (3000 Zellen/Messung) nach Kopplung an ein Chlormethyl-Fluorochromderivat bestimmt. Im Vergleich mit den Ergebnissen der intrazellulären Thiolexpression ist hier ein sehr deutlicher Effekt der alleinigen Gabe von α -Liponsäure zu verzeichnen, der jedoch nach 4 Behandlungstagen wieder aufgehoben ist. Im Gegensatz dazu bewirkt die kombinierte Applikation von α -Liponsäure und Ambroxol (Fig. 5a) bzw. α -Liponsäure und einem ACE-Hemmer (Fig. 5b) sowohl einen primär deutlicheren als auch über den Beobachtungszeitraum hinweg stabilen, superadditiven Anstieg der membranständigen Thiolexpression.

Beispiel 4

Einfluss auf die Phagozytosefähigkeit von Peritonealmakrophagen

Um eine Charakterisierung der Peritonealmakrophagen hinsichtlich ihrer originären Funktionen zu ermöglichen, wurde die Phagozytosefähigkeit als Messgröße ausgewählt.

Peritonealmakrophagen wurden analog des unter Bei-

spiel 3 beschriebenen Vorgehens isoliert und ex vivo kultiviert. Die Bestimmung der Phagozytoseleistung erfolgte durch einen zytofluorimetrischen Test auf Einzelzellebene. Dabei wurden die Makrophagen mit opsonierten und fluorochrommarkierten Bakterien co-

5 kultiviert. Die Menge der in einem definierten Zeitraum aufgenommenen Bakterien wurde quantitativ über die Fluoreszenzintensität in den Makrophagen erfaßt und galt als Maß für deren Phagozytosekapazität.

10 Der Einfluß der erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden Kombinationen auf die Phagozytosefähigkeit der Peritonealmakrophagen nach einer Behandlungsdauer von 6 Tagen ist in folgender Tabelle dargestellt.

15

	Phagozytoserate [mfi / 10.000 Zellen]
Kontrolle	371 ± 39
α -Liponsäure [50 μ M]	687 ± 59
Ambroxol [10 μ M]	501 ± 52
α -Liponsäure + Ambroxol	1.398 ± 286 (p<0.05)
Enalapril [5 μ M]	567 ± 59
α -Liponsäure + Enalapril	1.698 ± 241 (p<0.05)
Captopril [10 μ M]	653 ± 43
α -Liponsäure + Captopril	1.589 ± 176 (p<0.05)

Nach Inkubation mit α -Liponsäure, Ambroxol bzw. Enalapril war die Phagozytoserate gegenüber der unbehandelten Kontrolle um den Faktor 1,85 (α -Liponsäure),

1,35 (Ambroxol) bzw. 1,53 (Enalapril) erhöht. Demgegenüber konnte unter Verwendung der Kombination von α -Liponsäure und Ambroxol eine Steigerung der Phagozytoserate um den Faktor 3,7, bei Verwendung der Kombination von α -Liponsäure und einem ACE-Hemmer um den Faktor 4,6 (Enalapril) bzw. 4,3 (Captopril) erreicht werden.

Darüber hinaus konnte eine direkte Korrelation zwischen der Phagozytoserate und dem intrazellulären Thiolgehalt der Peritonealmakrophagen für die Kombination von α -Liponsäure und Ambroxol ($r=0,79$; $p<0,01$), α -Liponsäure und Captopril ($r=0,86$; $p<0,01$) sowie α -Liponsäure und Enalapril ($r=0,82$; $p<0,01$) nachgewiesen werden.

Beispiel 5

Einfluss auf den Differenzierungs- und Aktivierungsgrad sowie die Zytokinsynthese von Peritonealmakrophagen

Peritonealmakrophagen wurden von Patienten unter Nierenersatztherapie nach den unter Beispiel 3 beschriebenen Verfahren isoliert und in Gegenwart der erfindungsgemäß benannten Kombinationen von α -Liponsäure und Effektoren des Glutathionmetabolismus kultiviert. Nach 6 Tagen Inkubation wurde der Grad der Differenzierung der Peritonealmakrophagen über die Expression der Zelloberflächenantigene CD15 und CD11c sowie der Grad der zellulären Aktivierung über die

Koexpression der Aktivierungsantigene CD69 auf CD15-positiven Zellen sowie CD71 auf CD11c-positiven Zellen zytofluorimetrisch bestimmt.

- 5 Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

	CD15	CD11c	CD15/69	CD11c/71
Kontrolle	1,0	1,0	1,0	1,0
α -Liponsäure [50 μ M]	1,18 \pm 0,16	1,21 \pm 0,11	1,09 \pm 0,08	1,08 \pm 0,09
Ambroxol [10 μ M]	0,98 \pm 0,13	1,01 \pm 0,09	0,98 \pm 0,11	0,96 \pm 0,1
α -Liponsäure + Ambroxol	1,29 \pm 0,21	1,65 \pm 0,21	1,49 \pm 0,13	1,83 \pm 0,14
Enalapril [5 μ M]	1,21 \pm 0,22	1,23 \pm 0,22	1,19 \pm 0,12	1,10 \pm 0,14
α -Liponsäure+ Enalapril	2,12 \pm 0,16 (p<0.05)	1,99 \pm 0,15 (p<0.05)	1,69 \pm 0,2	1,58 \pm 0,12
Captopril [10 μ M]	1,19 \pm 0,14	1,26 \pm 0,24	1,69 \pm 0,21	1,52 \pm 0,16
α -Liponsäure + Captopril	2,25 \pm 0,2 (p<0.05)	2,63 \pm 0,23 (p<0.05)	1,74 \pm 0,19	1,61 \pm 0,18

- 10 Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der Reifungsmarker CD15 und CD11c unter Verwendung der Kombination von α -Liponsäure und Ambroxol deutlich, unter Verwendung der Kombination α -Liponsäure und ACE-Hemmer signifikant anstieg. Darüber hinaus war eine deutliche Zunahme der Aktivierungsantigene CD69
- 15 bzw. CD71 auf den jeweiligen Zellpopulationen nachweisbar. Die Applikation der Monosubstanzen hatte keinen oder nur marginalen Einfluss auf den Differenzierungs- und Aktivierungsgrad von Peritonealmakro-

phagen.

Parallel hierzu wurden in diesem experimentellen Ansatz die Zellkulturüberstände gewonnen und die darin enthaltenen, von den Peritonealmakrophagen synthetisierten und sekretierten Zytokine Interleukin-6 (IL-6) sowie Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra) bestimmt. Die Analyse erfolgte unter Verwendung der Enzymimmunoassay-Technik mit standardisierten Meßsystemen und ist in der folgenden Tabelle dargestellt, die die Effekte von α -Liponsäure und Effektoren des zellulären Glutathionmetabolismus auf die Zytokinsynthese von Peritonealmakrophagen nach einer Behandlungsdauer von 6 Tagen (n=10) zeigt.

15

	IL-6 [ng/10 ⁶ Zellen]	IL-1ra [ng/10 ⁶ Zellen]
Kontrolle	53.1 \pm 8.9	115.2 \pm 23.4
α -Liponsäure [50 μ M]	46.9 \pm 6.7	119.8 \pm 19.5
Ambroxol [10 μ M]	51.8 \pm 8.1	118.6 \pm 21.3
α -Liponsäure + Ambroxol	31.5 \pm 9.2 (p<0.05)	126.8 \pm 15.3 (p<0.05)
Enalapril [5 μ M]	41.7 \pm 7.3	121.1 \pm 16.9
α -Liponsäure + Enalapril	22.3 \pm 8.1 (p<0.05)	139.8 \pm 22.1 (p<0.05)
Captopril [10 μ M]	42.9 \pm 7.7	129.4 \pm 25.1
α -Liponsäure + Captopril	28.1 \pm 6.1 (p<0.05)	143.5 \pm 18.7 (p<0.05)

In Gegenwart der Kombination von α -Liponsäure und Ambroxol sowie der Kombination von α -Liponsäure und den unterschiedlichen ACE-Inhibitoren war eine signifikante Reduktion der IL-6 Synthese nachweisbar. Dieser Effekt ging wiederum deutlich über die Summe der durch die Monosubstanzen vermittelten Verringerung hinaus. Die Synthese von IL-1ra wurde unter diesen Bedingungen signifikant induziert. Auch hier war ein superadditiver Einfluss der Kombination von α -Liponsäure und Ambroxol bzw. ACE-Inhibitoren zu verzeichnen.

Beispiel 6

Einfluss auf die Stabilität der Thiolrestitution bei Peritonealmakrophagen im Dialysemmodell

Die unter Beispiel 3 beschriebenen, mittels der erfindungsgemäß zur Anwendung kommenden Kombinationen thiolrestituierten Peritonealmakrophagen wurden nach 6 Tagen diesem Testsystem entnommen und über einen Zeitraum von 14 Tagen in einem Dialysemmodell kultiviert. Hierzu wurden die Peritonealmakrophagen auf mobilen Kollagen IV-beschichteten Matrices adaptiert und 3 mal täglich für je 60 Minuten mit herkömmlicher Dialyselösung in Kontakt gebracht. Dieses Modell diente hier zur Induktion eines kombinierten hyperglykämischen/osmotischen Stresses. In Fig. 6 ist die Wirkung der Kombination von α -Liponsäure und Ambroxol

(Fig. 6a) sowie α -Liponsäure und Enalapril (Fig. 6b) auf die intrazelluläre Thiolexpression der Peritonealmakrophagen in der Zeitkinetik dargestellt. Die Membranexpression von Thiolen wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (mfi) der Probe (3000 Zellen/Messung) nach Kopplung an ein Chlormethyl-Fluorochromderivat bestimmt.

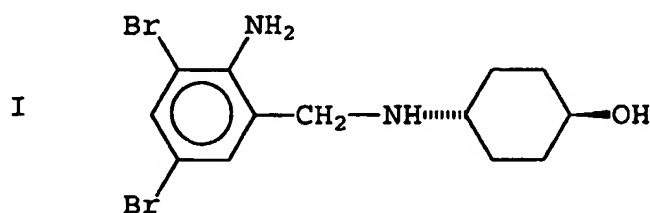
Während bei den primär thiolrestituierten, in diesem Dialysemodell unbehandelten Kontrollen innerhalb der ersten 4 Tage ein nahezu lineares Absinken der intrazellulären Thiolkonzentration zu verzeichnen war, resultiert die kombinierte Zugabe von α -Liponsäure und Ambroxol sowie von α -Liponsäure und Enalapril in einem konstanten intrazellulären Thiolstatus auf dem Niveau der primären Restitution. Auch hier ist insbesondere durch α -Liponsäure ein Monoeffekt nachweisbar, der jedoch nur kurz anhaltend ist und nach ca. 4 Tagen im Dialysemodell nur etwa 50% der Wirkung der Kombinationen zeigt.

Ein ähnliches Bild bietet sich bei der Betrachtung der in Fig. 7 dargestellten Verläufe der membrangebundenen Thiolexpression. Wiederum werden die durch die primäre Thiolrestitution erhaltenen Quantitäten durch Verwendung der Kombination von α -Liponsäure und Ambroxol (Fig. 7a) bzw. ACE-Hemmern (Fig. 7b) konstant gehalten, während unter Zugabe der Monosubstanzen nur intermediäre (α -Liponsäure) bzw. marginale Effekte (Ambroxol, Enalapril) beobachtet wurden.

5 Insgesamt machen diese Versuche deutlich, daß die Applikation der Kombination von α -Liponsäure und den Effektoren des Glutathionmetabolismus Ambroxol bzw. ACE-Inhibitoren einen primär massiv geschädigten Thiolstatus in unterschiedlichen Zellsystemen stabilisiert. Durch diese Normalisierung kommt es darüber hinaus zu einer Wiederherstellung zentraler zellulärer immunregulatorischer Funktionen, welche ohne eine solche Behandlung nicht zu verzeichnen ist.

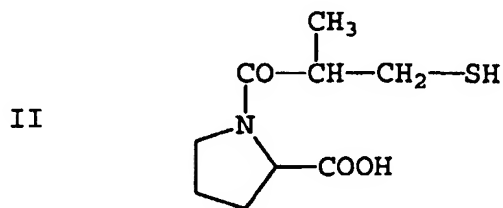
Patentansprüche

1. Arzneimittel enthaltend einen Effektor des
Glutathionmetabolismus zusammen mit α -
Liponsäure, deren Salze und/oder deren Prodrugs
als Kombinationspräparat zur gleichzeitigen, ge-
trennten oder zeitlich abgestuften Behandlung
einer Störung des Thiol-Disulfid-Status im Rah-
men der Nierenersatztherapie sowie Krankheits-
bildern, bei denen eine Störung des Thiol-
Disulfid-Status von Immunzellen auftritt.
2. Arzneimittel nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass die Dosis der α -
Liponsäure, deren Salze und/oder deren Prodrugs
für die humanmedizinische Applikation beim Pati-
enten zwischen 30 und 1200 mg/d, bevorzugt zw-
ischen 200 und 600 mg/d liegt.
3. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass als Effektor Am-
broxol mit der allgemeinen Formel I,



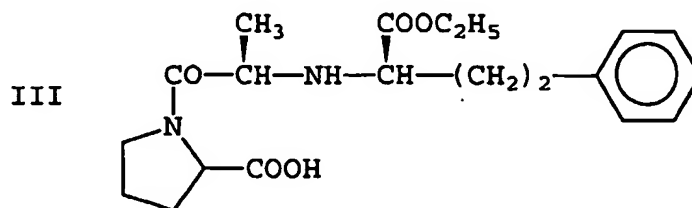
- deren Salze und/oder deren Prodrugs verwendet
wird.

4. Arzneimittel nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet, dass die Dosis von Am-
broxol, deren Salze und/oder deren Prodrugs für
die humanmedizinische Applikation beim Patienten
zwischen 7,5 und 90 mg/d, bevorzugt zwischen 60
und 75 mg/d liegt.
5. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, dass als Effektor ein
Inhibitor des Angiotensin-Converting-Enzyms
(ACE-Inhibitor) verwendet wird.
6. Arzneimittel nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet, dass die Dosis des Inhi-
bitors des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE-
Inhibitor) für die humanmedizinische Applikation
beim Patienten zwischen 0,2 und 20 mg/d liegt.
7. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, dass als ACE-Hemmer 1-
[(2S)-3-Mercapto-2-methylpropionyl]-L-prolin
(Captopril) der Formel II



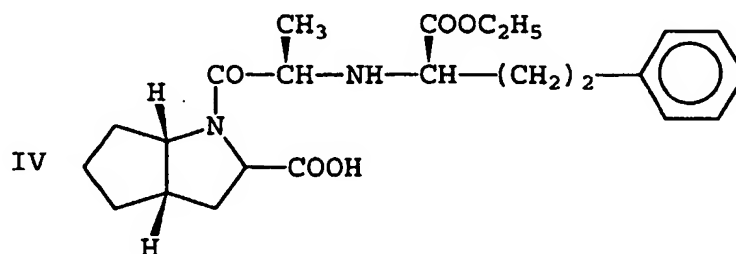
verwendet wird.

8. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass als ACE-Hemmer 1-{N-[(S)-1-Ethoxycarbonyl-3-phenylpropyl]-L-alanyl}-L-prolin (Enalapril) der Formel III



verwendet wird.

9. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass als ACE-Hemmer (2S,3aS,6aS)-1-{(S)-N-[(S)-1-Ethoxycarbonyl-3-phenylpropyl]-alanyl}-octahydrocyclopenta[b]-pyrrol-2-carbonsäure (Ramipril) der Formel IV



verwendet wird.

10. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Verabreichung oral oder parenteral erfolgt.
11. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass weitere Additive ausgewählt sind aus der Gruppe wäßriger Lösungsmittel, Stabilisatoren, Suspensions-, Dispersions- und Benetzungsmittel.

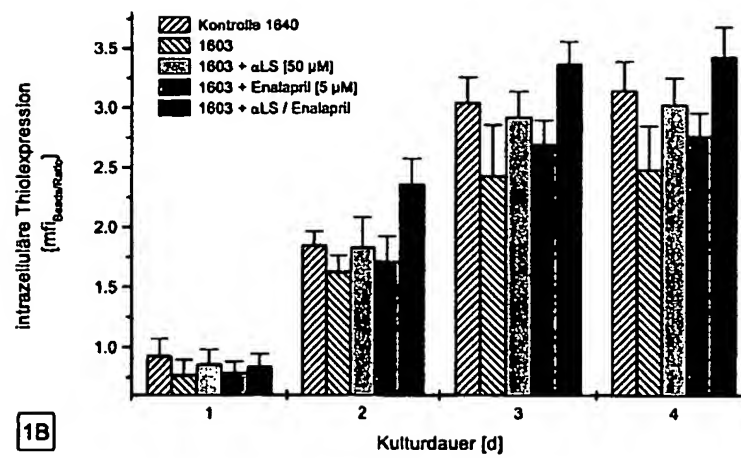
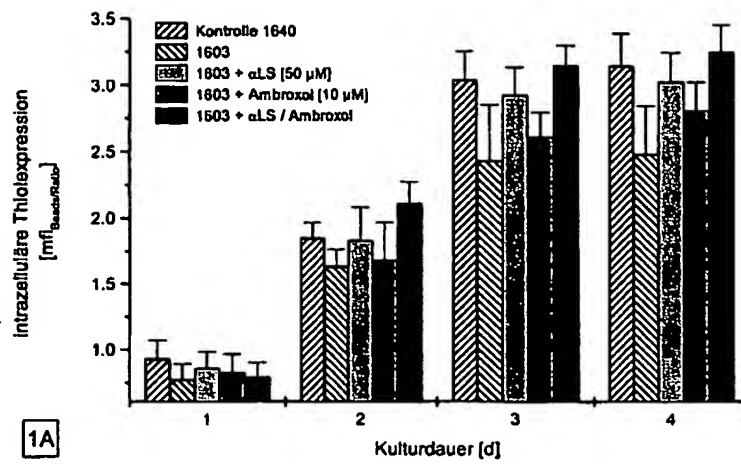
12. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 11 in Form einer Lösung, eines Granulats, eines Pulvers, einer Emulsion, einer Tablette und/oder Filmtablette.
- 5 13. Verwendung von mindestens einem Effektor des Glutathionmetabolismus zusammen mit α -Liponsäure, deren Salze und/oder deren Prodrugs zur Herstellung eines Arzneimittels zur gleich-
10 zeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Behandlung einer Störung des Thiol-Disulfid-Status im Rahmen der Nierenersatztherapie sowie Krankheitsbildern, bei denen eine Störung des Thiol-Disulfid-Status von Immunzellen auftritt.
- 15 14. Verwendung von mindestens einem Effektor des Glutathionmetabolismus zusammen mit α -Liponsäure, deren Salze und/oder deren Prodrugs zur Herstellung eines Arzneimittels zur gleich-
20 zeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften immunmodulatorischen und/oder abwehrsteigernden Behandlung.
- 25 15. Verwendung von mindestens einem Effektor des Glutathionmetabolismus zusammen mit α -Liponsäure, deren Salze und/oder deren Prodrugs zur Herstellung eines Arzneimittels zur gleich-
zeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften entzündungshemmenden Behandlung.
- 30 16. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Effektor des Glutathionmetabolismus und die α -Liponsäure, de-

ren Salze und/oder deren Prodrugs in einer einzigen Formulierung vorliegen.

- 5 16. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Effektor des Glutathionmetabolismus und die α -Liponsäure, deren Salze und/oder deren Prodrugs in getrennten Formulierungen vorliegen.

Fig. 1

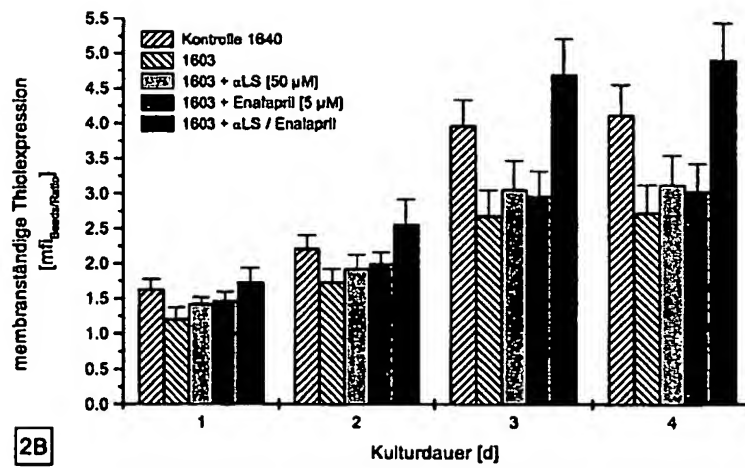
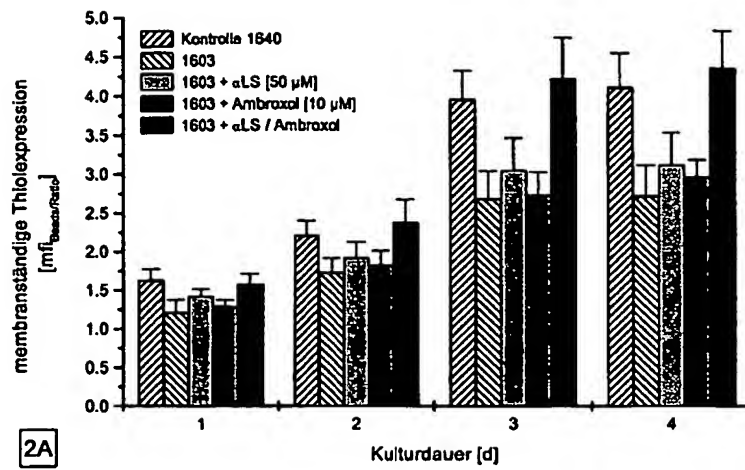
1/7



BEST AVAILABLE COPY

2/7

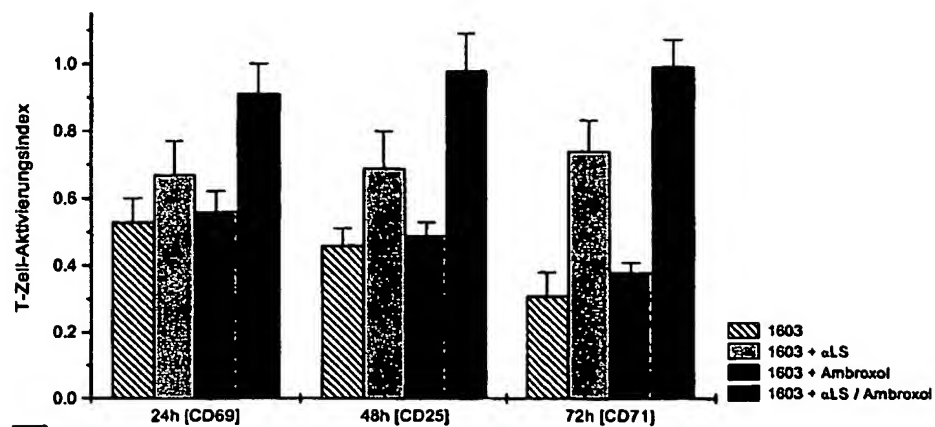
Fig. 2



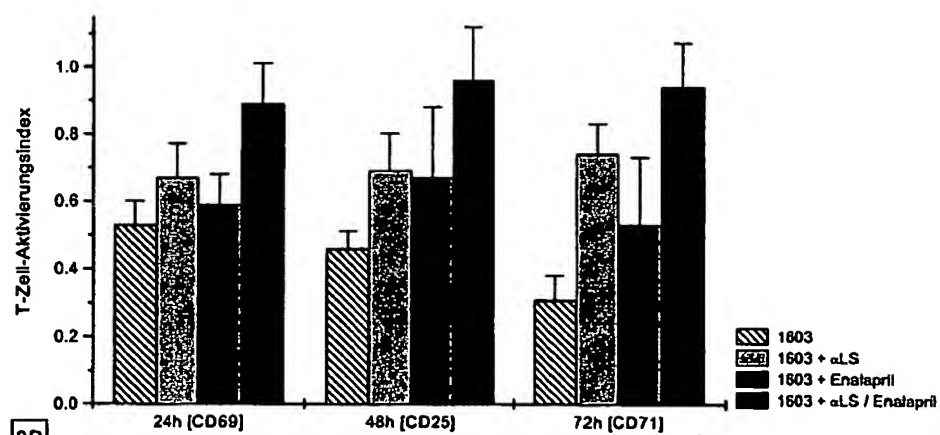
BEST AVAILABLE COPY

Fig. 3

3/7



3A

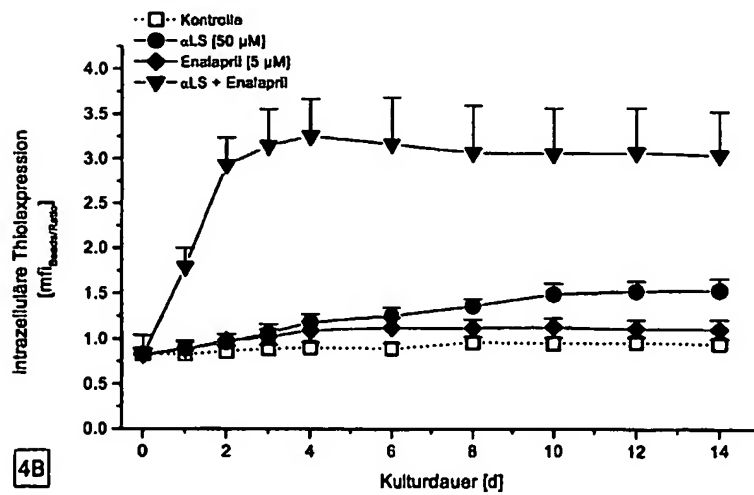
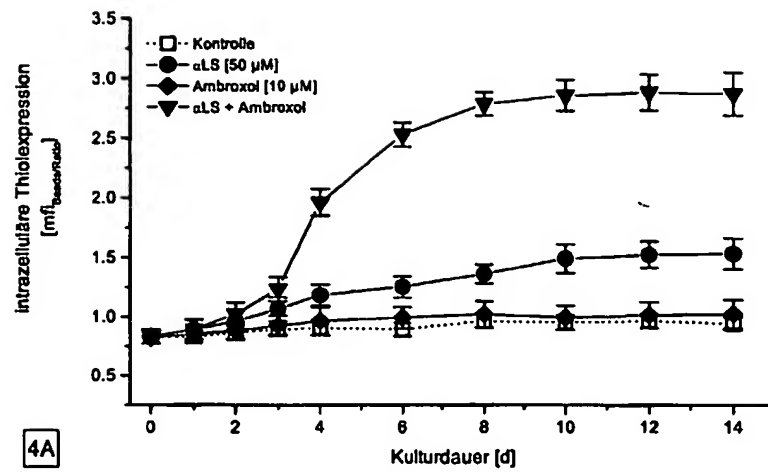


3B

BEST AVAILABLE COPY

4/7

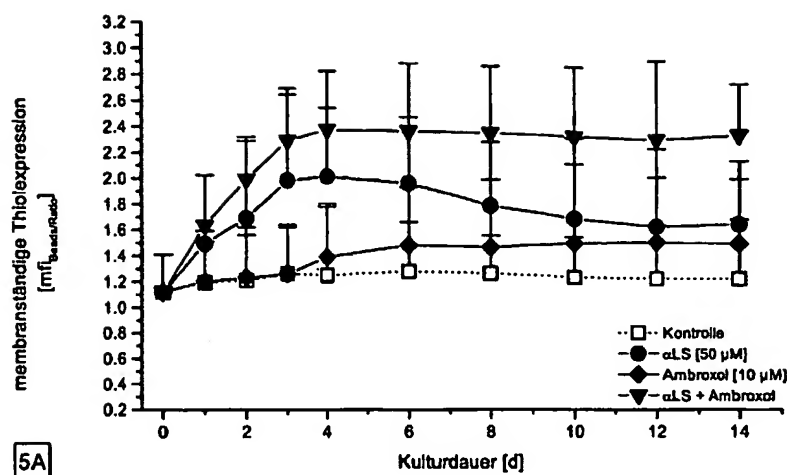
Fig. 4



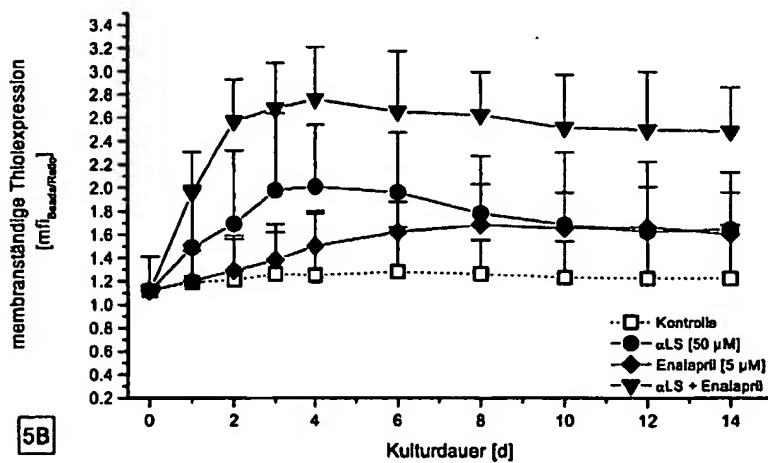
BEST AVAILABLE COPY

Fig. 5

5/7



5A

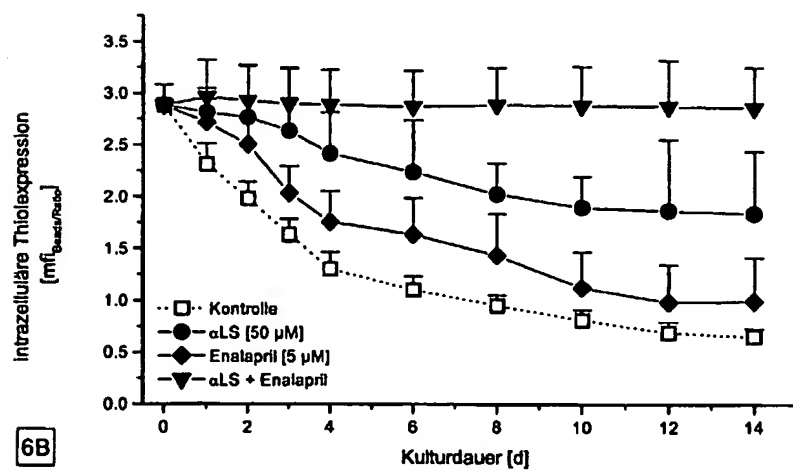
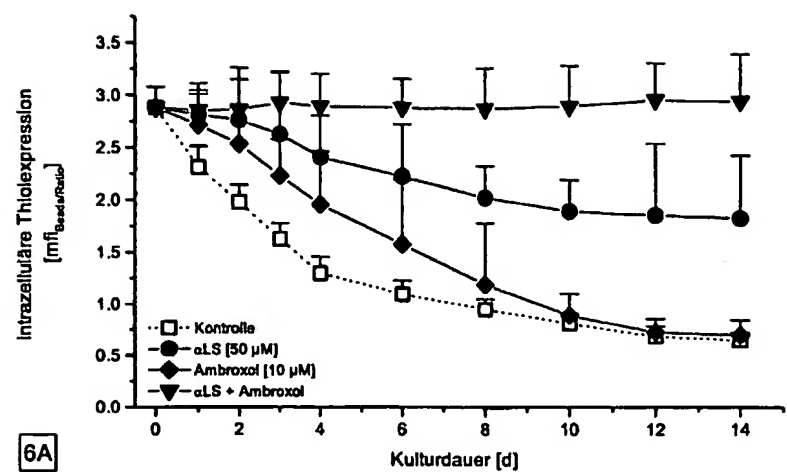


5B

BEST AVAILABLE COPY

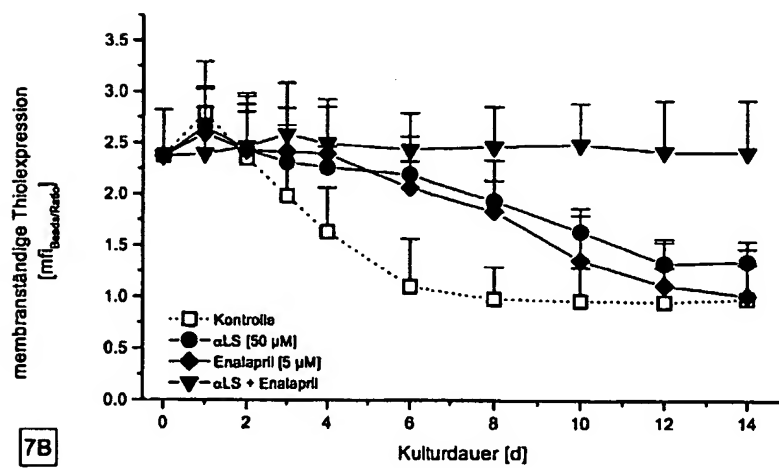
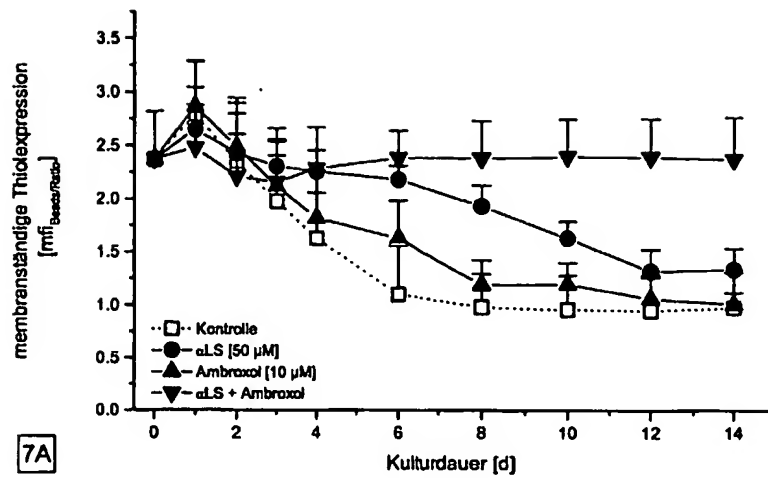
Fig. 6

6/7



7/7

Fig. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/DE 02/01991

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/385 A61K31/401 A61K31/403 A61K31/137 A61P13/12
 //(A61K31/385, 31:137), (A61K31/401, 31:385), (A61K31/403, 31:385)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 44 20 102 A (ASTA MEDICA AG) 14 December 1995 (1995-12-14) cited in the application page 13, line 31-33; claims; examples 7,8 ---	1,2, 5-13,16, 17
Y	EP 0 427 247 A (ASTA PHARMA AG) 15 May 1991 (1991-05-15) cited in the application column 7, line 41 -column 8, line 19 --- -/--	1-17



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 October 2002

Date of mailing of the international search report

17/10/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Herrera, S

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HAN D ET AL: "A-LIPOIC ACID INCREASE INTRACELLULAR GLUTATHIONE IN A HUMAN T-LYMPHOCYTE JURKAT CELL LINE" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 207, no. 1, 1995, pages 258-264, XP000887357 ISSN: 0006-291X abstract	1-17
Y	DE 38 04 858 A (THOMAE GMBH DR K) 31 August 1989 (1989-08-31) abstract	1-4, 10-17

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4420102	A	14-12-1995	DE 4420102 A1	14-12-1995
EP 0427247	A	15-05-1991	AT 163849 T	15-03-1998
			CA 2029596 A1	10-05-1991
			DE 4035442 A1	16-05-1991
			DE 59010810 D1	16-04-1998
			DK 427247 T3	28-09-1998
			EP 0427247 A2	15-05-1991
			EP 0812590 A2	17-12-1997
			ES 2115589 T3	01-07-1998
			GR 90100796 A ,B	17-04-1992
			IE 904034 A1	22-05-1991
			JP 3169813 A	23-07-1991
			PT 95826 A ,B	13-09-1991
			US 6271254 B1	07-08-2001
			US 5728735 A	17-03-1998
DE 3804858	A	31-08-1989	DE 3804858 A1	31-08-1989

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K31/385 A61K31/401 A61K31/403 A61K31/137 A61P13/12
 //(A61K31/385,31:137),(A61K31/401,31:385),(A61K31/403,31:385)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 44 20 102 A (ASTA MEDICA AG) 14. Dezember 1995 (1995-12-14) in der Anmeldung erwähnt Seite 13, Zeile 31-33; Ansprüche; Beispiele 7,8	1,2, 5-13,16, 17
Y	EP 0 427 247 A (ASTA PHARMA AG) 15. Mai 1991 (1991-05-15) in der Anmeldung erwähnt Spalte 7, Zeile 41 -Spalte 8, Zeile 19 --- -/--	1-17



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Oktober 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17/10/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Herrera, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	HAN D ET AL: "A-LIPOIC ACID INCREASE INTRACELLULAR GLUTATHIONE IN A HUMAN T-LYMPHOCYTE JURKAT CELL LINE" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, Bd. 207, Nr. 1, 1995, Seiten 258-264, XP000887357 ISSN: 0006-291X Zusammenfassung -----	1-17
Y	DE 38 04 858 A (THOMAE GMBH DR K) 31. August 1989 (1989-08-31) Zusammenfassung -----	1-4, 10-17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen
PCT/DE 02/01991

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. —
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr. —
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. —
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: —

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/SA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Der Gegenstand der Ansprüche 1 und 13 bis 16 ist durch ein funktionelles Merkmal definiert. Aufgrund der Charakterisierung der Komponenten durch dieses Merkmal ("einen Effektor des Glutathionmetabolismus") kann nicht garantiert werden dass die durchgeführte Recherche komplett ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Komponenten im Stand der Technik, die dieses funktionelle Merkmal ebenso erfüllen, nicht als solche identifiziert wurden. Im Falle, dass solche Komponenten auch in der Anmeldung nicht erkannt wurden, wurden sie ebenso nicht in die Recherche miteingeschlossen.

Die Recherche wurde durchgeführt ausgehend vom funktionellen Merkmal per se als auch von in der Anmeldung angeführten Beispielen.

Das gleiche gilt auch für den funktionell definierten Krankheitsbildern.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/01991

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument			Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4420102	A	14-12-1995	DE	4420102 A1		14-12-1995
EP 0427247	A	15-05-1991	AT	163849 T		15-03-1998
			CA	2029596 A1		10-05-1991
			DE	4035442 A1		16-05-1991
			DE	59010810 D1		16-04-1998
			DK	427247 T3		28-09-1998
			EP	0427247 A2		15-05-1991
			EP	0812590 A2		17-12-1997
			ES	2115589 T3		01-07-1998
			GR	90100796 A ,B		17-04-1992
			IE	904034 A1		22-05-1991
			JP	3169813 A		23-07-1991
			PT	95826 A ,B		13-09-1991
			US	6271254 B1		07-08-2001
			US	5728735 A		17-03-1998
DE 3804858	A	31-08-1989	DE	3804858 A1		31-08-1989